

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-018793

(43)Date of publication of application : 26.01.1999

(51)Int.Cl.

C12P 19/14

(21)Application number : 09-178057

(71)Applicant : UNITIKA LTD

(22)Date of filing : 03.07.1997

(72)Inventor : MORIMOTO AKIYOSHI
DONPOU MUNEHICO
YOSHIKAWA GENICHI

(54) PRODUCTION OF MANNOBIOSE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To efficiently obtain the subject saccharide useful as a raw material, etc., for foods, feed and medicines by reacting mannan, glucomannan, galactomannan or a natural product containing these materials with a mannan decomposing enzyme such as *Aspergillus niger*.

SOLUTION: Mannan, glucomannan, galactomannan or a natural product containing these materials (e.g. copra meal) is reacted with a mannan- decomposing enzyme derived from *Aspergillus niger* (e.g. galactomannanase) in an aqueous suspension at 50° C for 18 hr under stirring to carry out decomposition reaction of mannan, etc., and the reaction mixture is allowed to stand and the supernatant is filtered to afford a clear solution containing mannobiose. The solution is defatted with ethyl ether and passed through a porous type strongly basic anion exchange resin, a strongly acidic cation exchange resin and a weakly basic anion exchange resin in this order and the resultant solution is concentrated by an evaporator and crystallized by adding ethanol thereto to efficiently provide the objective mannobiose.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-18793

(43) 公開日 平成11年(1999) 1月26日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 P 19/14

C 1 2 P 19/14

A

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平9-178057

(22) 出願日 平成9年(1997) 7月3日

(71) 出願人 000004503

ユニチカ株式会社

兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地

(72) 発明者 森本 明美

京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

(72) 発明者 鈍實 宗彦

京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

(72) 発明者 吉川 源一

京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

(54) 【発明の名称】 マンノピオースの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 食品、飼料及び医薬品原料として有用なマンノピオースを効率良く製造する方法を提供する。

【解決手段】 マンナン、グルコマンナン、ガラクトマンナン又はこれらを含む天然物にアスペルギルス・ニガー由来のマンナン分解酵素を作用させることを特徴とするマンノピオースの製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 マンナン、グルコマンナン、ガラクトマンナン又はこれらを含む天然物にアスベルギルス・ニガー由来のマンナン分解酵素を作用させることを特徴とするマンノビオースの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、食品、飼料あるいは医薬品原料として有用なマンノビオースの製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】マンノビオースはD-マンノースが2分子グリコシド結合した2糖類であり、ココナツヤシ胚乳、そうげヤシ胚乳、針葉樹、グアー豆、イナゴ豆等の豆類、こんにゃく等に含まれるマンナンを酸や酵素で部分加水分解し、加水分解液から精製単離することにより得られる。従来、このグリコシド結合を切断する酵素としては、アスベルギルス属、バチルス属、ストレプトミセス属、ペニシリウム属に属する微生物が産生するマンナン分解酵素が知られている〔熱帯農業(Japanese Journal of Tropical Agriculture) 29 (3), 167-172 (1985)、特公平8-2591948号公報〕。しかし、これらの酵素は、そのβ-マンナナーゼ活性が低いため、長時間反応させることが必要となり、そのため製造コストが高くなるという問題点があった。さらに、長時間反応させたとしても十分に分解されず、オリゴ糖が生成し、マンノビオースの収率が低いという問題点があった。

【0003】また、特開昭63-209595号公報には、ペニシリウム属由来のβ-マンナナーゼがマンナンからマンノビオースを遊離し、さらに、マンノトリオース等のオリゴ糖をほとんど遊離しないことが報告されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかし、このペニシリウム属由来のβ-マンナナーゼを用いてもマンノビオースの収率は十分ではないという問題点があった。さらに、このような酵素法で製造したマンノビオースを食品や飼料等の用途に使用する場合、酵素を産生する微生物が食品製造用としての安全性が確立されていないと、製造したマンノビオースの安全性についても問題となる。本発明は、マンナン及びマンナン含有物から酵素法によってマンノビオースを収率良く製造する方法を提供することを目的とするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、このような課題を解決するために鋭意検討の結果、アスベルギルス・ニガー由来の酵素がマンナン等に作用してマンノビオースを特異的に遊離させ、収率よくマンノビオースを得ることができるということを見出し、本発明に到達し

た。すなわち、本発明は、マンナン、グルコマンナン、ガラクトマンナン又はこれらを含む天然物にアスベルギルス・ニガー由来のマンナン分解酵素を作用させることを特徴とするマンノビオースの製造方法を要旨とするものである。

【0006】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明に用いられるマンナン、グルコマンナン、ガラクトマンナン（以下、これらを総称してマンナンという。）としては、コブラマンナン、ローカストビーンガム、グアーガム、コンニャクマンナン等が挙げられる。また、これらのマンナンを含む天然物としては、ココナツヤシ胚乳、そうげヤシ胚乳、針葉樹、グアー豆やイナゴ豆等の豆類、コンニャクイモ等が挙げられる。本発明においては、これらの天然物をそのまま用いてもよく、これらの天然物からマンナンを抽出して使用してもよいが、マンナンを抽出する操作は煩雑であり、さらに製造コストも高くなるため、そのまま用いることが好ましい。

【0007】本発明に用いられる酵素としては、アスベルギルス・ニガー由来であり、マンナンに作用してマンノビオースを遊離する活性のあるものであれば、特に限定されるものではない。アスベルギルス・ニガーは、デンプン加工用に使用される液化アミラーゼ、果汁清澄用に使用されるペクチナーゼ、食品加工に使用されるプロテアーゼ、コーヒーの抽出率向上のために使用されるヘミセルラーゼ等の酵素の生産菌として古くから使用されており、安全性が確立された菌である。

【0008】このような酵素は、アスベルギルス・ニガーを培養することにより得ることができる。培養の方法としては、マンナン分解酵素が産生される方法であれば特に限定されるものではなく、固体培養、液体培養等の通常の培養方法を用いればよい。また、培養条件としても、通常の条件で培養を行えばよい。本発明においては、マンナン分解活性を含むいかなる画分を使用してもよく、必要に応じてマンナン分解活性を含む画分を常法により精製あるいは部分精製したものを使用することもできる。

【0009】また、市販の酵素剤を使用してもよく、そのような酵素剤としては、スミチームACH、スミチームAC（いずれも新日本化学工業株式会社）等が挙げられる。これらの酵素剤は、食品用酵素剤として市販されているものであり、食品用途としての使用実績があり、安全性が確立されている。スミチームACHはアスベルギルス・ニガーが産生するヘミセルラーゼの1種で、以下のような理化学的性質を有している。

（1）作用及び基質特異性

α-ガラクトシダーゼ活性、β-ガラクトシダーゼ活性を有するが、β-マンノシダーゼ活性は低いか、ほとんど活性を有さない。マンナン及びガラクトマンナンに作

用してマンノビオースを生成する。

(2) 最適 pH 及び作用 pH

最適 pH は 4.5 であり、pH 3.0~6.0 の間で実用的に作用する。

(3) 作用適温の範囲

反応の最適温度は 60℃ で 30℃~70℃ の間で実用的に作用する。

(4) 力価の測定

相対粘度約 6 のローストビーイング水溶液 (pH 4.5) 1 ml の粘度を 40℃ で 1 分間に半減させる酵素活性を 1/100 単位 (ユニット) とする。この市販酵素の酵素活性はガラクトマンナーゼ活性として 50,000 ユニット/g である。

【0010】また、スミチーム AC はアスペルギルス・ニガー由来のセルラーゼであるが、ヘミセルラーゼ活性も有している。この酵素を理化学的性質を以下に示す。

(1) 作用及び基質特性

セルロース及びヘミセルロース活性を有する。マンナンに作用してマンノビオースを生成する。

(2) 最適 pH 及び作用 pH

最適 pH は 4.5 であり、pH 3.0~5.5 の間で実用的に作用する。

(3) 作用適温の範囲

反応の最適温度は 60℃ で 30℃~70℃ の間で実用的に作用する。

(4) 力価の測定

カルボキシメチルセルロースナトリウム (pH 5.0) を基質とし、40℃、1 分間に 1 μmol の還元糖を遊離する酵素活性を 1 単位 (ユニット) とする。この市販酵素の酵素活性はセルラーゼ活性として 2,000 ユニット/g である。

【0011】マンナン又はマンナンを含有する天然物に上記の酵素を作用させる条件としては、通常の酵素反応に用いられる条件であれば特に問題はないが、使用する酵素の最適作用条件で反応することが望ましい。反応の温度としては、酵素が失活しない条件下で反応を行うことが望ましいが、反応液の腐敗を防止するために微生物が増殖しにくい温度で反応することが望ましく、20~90℃、好ましくは 40~80℃、さらに好ましくは 50~75℃ がよい。また、反応の pH としては、酵素の最適作用条件下で反応を行うのが望ましいことは言うまでもなく、pH 2~9、好ましくは pH 2.5~8、さらに好ましくは pH 3~6 がよい。反応時間は使用する酵素の量に依存するが、通常 3 時間から 48 時間の間に設定するのが作業上望ましい。

【0012】このようにして得られたマンノビオースは、さらにイオン交換樹脂や活性炭を用いた各種クロマトグラフィーを用いて精製することができる。また、噴霧乾燥によって粉末状にしたり、エタノールを添加することにより結晶化させることができる。

【0013】

【実施例】次に、本発明を実施例によって具体的に説明する。

実施例 1

コブラミール 200 g (脂肪分 10%、水分 7.2%) を 2 L の水に懸濁した後、スミチーム ACH (新日本化学工業株式会社製ガラクトマンナーゼ、力価 50,000 ユニット/g) を 1 g 添加し、50℃ で 18 時間攪拌下で反応させた。反応終了後、静置し、上澄みを濾過することによりマンノビオースを含む清澄な溶液 1.9 L を得た。この溶液中の糖の分析を高速液体カラムクロマトグラフィーにより行った。分析用カラムは島津社製 LC-6A を用い、カラム温度は 60℃、流速 0.4 ml/min、移動相は 0.5 M のホウ酸緩衝液 (pH 8.7)、ポストカラムで誘導体化して蛍光検出器により検出した。標準品の定量値からマンノビオースの含有量を求めた。その結果、1.9 L 中に 42 g のマンノビオースが蓄積していた。

【0014】次いで、この溶液をエチルエーテルで脱脂した後、ポーラス型強塩基性陰イオン交換樹脂 PA308 (三菱化学社製、Cl⁻ 型、ベッドボリューム 100 ml)、強酸性陽イオン交換樹脂 SK1B (三菱化学社製、H⁺ 型、ベッドボリューム 100 ml)、弱塩基性陰イオン交換樹脂 WA30 (三菱化学社製、OH⁻ 型、ベッドボリューム 100 ml) にこの順序で通液し、マンノビオースを含む溶液を回収した。回収した溶液をブリックス 70 となるまでエバポレーターで濃縮し、マンノビオースを含む糖液 112 g を得た。この濃縮液に 50 ml のエタノールを加えて結晶化させたところ 39 g のマンノビオースが得られた。

【0015】実施例 2

コブラミール 200 g (脂肪分 10%、水分 7.2%) を 2 L の水に懸濁した後、スミチーム AC (新日本化学工業株式会社製セルラーゼ、力価 2,000 ユニット/g) を 2 g 添加し、60℃ で 24 時間攪拌下で反応させた。反応終了後、静置し、上澄みを濾過することによりマンノビオースを含む清澄な溶液 1.9 L を得た。この溶液中の糖の分析を実施例 1 と同様にして、高速液体カラムクロマトグラフィーにより行った結果、1.9 L 中に 38 g のマンノビオースが蓄積していた。

【0016】次いで、この溶液をエチルエーテルで脱脂した後、ポーラス型強塩基性陰イオン交換樹脂 PA308 (三菱化学社製、Cl⁻ 型、ベッドボリューム 100 ml)、強酸性陽イオン交換樹脂 SK1B (三菱化学社製、H⁺ 型、ベッドボリューム 100 ml)、弱塩基性陰イオン交換樹脂 WA30 (三菱化学社製、OH⁻ 型、ベッドボリューム 100 ml) にこの順序で通液し、マンノビオースを含む溶液を回収した。回収した溶液をブリックス 70 となるまでエバポレーターで濃縮した後、エタノールを最終濃度 85 容量% となるように添加し、

少量の結晶D-マンノビオースを添加し、4℃で放置した。この溶液を濾過することにより、20gの結晶マンノビオースを得た。得られたマンノビオースの融点は191～192℃であった。

【0017】実施例3

ローカストビーンガム200gを2Lの水に懸濁した後、スミチームACH（新日本化学工業株式会社製ガラクトマンナーゼ、力価50,000ユニット/g）を1.6g添加し、55℃で18時間攪拌下で反応させた。反応終了後、濾過することによりマンノビオースを含む清澄な溶液1.9Lを得た。この溶液中の糖の分析を実施例1と同様にして高速液体カラムクロマトグラフィーにより行った結果、1.9L中にマンノビオース80gが蓄積していた。

【0018】次いで、この溶液をポーラス型強塩基性陰イオン交換樹脂PA308（三菱化学社製、Cl⁻型、ベッドボリューム100ml）、強酸性陽イオン交換樹脂SK1B（三菱化学社製、H⁺型、ベッドボリューム100ml）、弱塩基性陰イオン交換樹脂WA30（三菱化学社製、OH⁻型、ベッドボリューム100ml）にこの順序で通液し、マンノビオースを含む溶液を回収した。回収した溶液を噴霧乾燥することによりマンノビオースを含む白色粉末126gを得た。

【0019】実施例4

グアーガム200gを2Lの水に懸濁した後、スミチームACH（新日本化学工業株式会社製ガラクトマンナーゼ、力価50,000ユニット/g）を1.6g添加し、55℃で18時間攪拌下で反応させた。反応終了後、濾過することによりマンノビオースを含む清澄な溶液1.9Lを得た。この溶液中の糖の分析を実施例1と同様にして高速液体カラムクロマトグラフィーにより行った結果、1.9L中にマンノビオース60gが蓄積していた。

【0020】次いで、この溶液をポーラス型強塩基性陰イオン交換樹脂PA308（三菱化学社製、Cl⁻型、ベッドボリューム100ml）、強酸性陽イオン交換樹脂SK1B（三菱化学社製、H⁺型、ベッドボリューム100ml）、弱塩基性陰イオン交換樹脂WA30（三菱化学社製、OH⁻型、ベッドボリューム100ml）にこの順序で通液し、マンノビオースを含む溶液を回収した。回収した溶液を噴霧乾燥することによりマンノビオースを含む白色粉末112gを得た。

【0021】

【発明の効果】本発明によれば、食品、飼料及び医薬品原料として有用なマンノビオースを収率良く製造することができる。